

Fe³⁺ 配位调控分光光度法快速检测 3,4-二羟基苯乙醇

周隽涵 郑建仙 孙 璐

(华南理工大学, 广东 广州 510641)

摘要: [目的] 解决在 4-羟基苯乙醇 (HPET) 催化体系中快速检测 3,4-二羟基苯乙醇 (DHPET) 因传统紫外分光光度法光谱重叠干扰受限问题。[方法] 针对现有方法特异性不足的问题, 提出基于 Fe³⁺ 配位调控的分光光度快速检测法, 通过 Fe³⁺ 与 DHPET 邻苯二酚基团的双齿螯合作用, 诱导特征吸收光谱红移至 760 nm, 显著区别于单酚化合物的弱配位响应。[结果] 优化条件后, 方法线性范围为 3~100 mmol/L ($R^2=0.998$), 检出限为 0.709 mmol/L, 精密度 (RSD) < 2%, 满足工业催化体系实时监测需求。[结论] 双齿配位增强选择性的分子机制在酶催化体系中具有实用性, 可为 DHPET 工业化生产提供低成本、快速的分析工具。

关键词: 紫外—可见分光光度法; Fe³⁺ 配位; 3,4-二羟基苯乙醇; 选择性检测; 金属—多酚络合

Rapid detection of 3,4-dihydroxyphenylethanol by ultraviolet spectrophotometry based on Fe³⁺ coordination modulation

ZHOU Junhan ZHENG Jianxian SUN Lu

(South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510641, China)

Abstract: [Objective] To address the limitation of spectral overlap interference in the rapid detection of 3,4-dihydroxyphenylethanol (DHPET) within the 4-hydroxyphenethyl alcohol (HPET) catalytic system using traditional ultraviolet spectrophotometry. [Methods] To overcome the insufficient specificity of existing methods, a rapid spectrophotometric detection method based on Fe³⁺ coordination modulation was proposed. Through bidentate chelation between Fe³⁺ and the catechol group of DHPET, the characteristic absorption spectrum was induced to undergo a bathochromic shift to 760 nm, significantly distinguishing it from the weak coordination response of monophenolic compounds. [Results] After optimization, the method exhibited a linear range of 3~100 mmol/L ($R^2=0.998$), a detection limit of 0.709 mmol/L, and precision with RSD < 2%, meeting the requirements for real-time monitoring in industrial catalytic systems. [Conclusion] The molecular mechanism of enhanced selectivity through bidentate coordination is practical in enzymatic catalytic systems, providing a low-cost, rapid analytical tool for the industrial production of DHPET.

Keywords: UV spectrophotometry; Fe³⁺ coordination; 3,4-dihydroxyphenylethanol; selective detection; metal-polyphenol complexation

3,4-二羟基苯乙醇 (3,4-dihydroxyphenylethanol, DHPET) 是一种天然多酚化合物, 广泛存在于橄榄及其衍生产物中, 凭借其邻苯二酚结构的强抗氧化与抗菌活性^[1], 在食品保鲜、医药及功能性食品领域展现出重要应用潜力。使用 4-羟基苯乙醇 (4-hydroxyphenethyl alcohol, HPET) 作为底物进行生物转化是获得 DHPET 的最方便

快捷的途径^[2], 优势在于反应体系仅存在 DHPET 和 HPET 两种化合物, 无需复杂分离, 且酶法相比于化学合成法具有高度的立体选择性和化学选择性^[3]。

但现开发的定量区分 DHPET 与 HPET 的方法较为传统, 以高效液相色谱 (HPLC) 和液相色谱—质谱联用 (LC-MS) 为主。Piñeiro 等^[4]开发了一种荧光检测高效液相色谱

通信作者: 郑建仙 (1966—), 男, 华南理工大学教授, 博士。E-mail: feixzhen@scut.edu.cn

收稿日期: 2025-03-30 改回日期: 2025-07-04

引用格式: 周隽涵, 郑建仙, 孙璐. Fe³⁺ 配位调控分光光度法快速检测 3,4-二羟基苯乙醇 [J]. 食品与机械, 2025, 41(9): 42-51.

Citation: ZHOU Junhan, ZHENG Jianxian, SUN Lu. Rapid detection of 3,4-dihydroxyphenylethanol by ultraviolet spectrophotometry based on Fe³⁺ coordination modulation [J]. Food & Machinery, 2025, 41(9): 42-51.

谱方法(HPLC-FLD),用于检测DHPET和HPET;Miralles等^[5]通过液相色谱法测定橄榄提取物中的DHPET和HPET,用于化妆品的质量控制。现有检测方法虽精度高,但仪器昂贵、前处理复杂,难以满足优化反应进程中快速检测需求;且DHPET/HPET酶促反应因其体系简单而被广泛应用,复杂的检测工序与优化反应简便的目的背道而驰。传统紫外分光光度法虽操作简便,但因DHPET光谱于非可见光区域,且与其反应前体HPET互为结构类似物,其特征吸收峰光谱重叠,检测特异性不足,限制了其在酶催化工艺优化体系中的应用。

非共价配位化学为提升光谱检测选择性提供了新思路,金属离子与酚类化合物的配位作用可通过调控电子跃迁路径,诱导特征吸收峰位移,从而增强目标物的光谱响应特异性。Sun等^[6]开发了一种铁/氮共掺杂碳点(Fe/N-CDs),结合紫外—可见吸收与荧光光谱双模式检测多巴胺,其检测限低至0.13 μmol/L,且抗干扰能力显著优于传统单波长法;Espina等^[7]系统研究了铁—单宁酸复合物的多光谱学特性,发现邻苯二酚基团与Fe³⁺的配位作用可诱导吸收光谱红移,并通过特征峰分离实现多酚的精准识别。这些成果为克服在含大量HPET中检测DHPET的光谱干扰问题提供了重要启示:通过引入金属配位反应调控吸收特性,可能成为优化分光光度法选择性的有效途径。

现有关于天然产物含量研究多集中于多酚定性分析,针对DHPET定量检测的配位策略及条件优化尚未系统开展,此类定性研究方法不适用于生产DHPET中过程监测,且对共存干扰物HPET的抗干扰机制缺乏深入解析。基于此,研究拟提出一种基于Fe³⁺配位调控的紫外—可见分光光度法,通过系统研究Fe-DHPET络合物形成的影响,优化显色反应条件,建立适用于HPET催化反应基质的检测方法,以期实现DHPET的高效、精准检测。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

4-羟基苯乙醇、3,4-二羟基苯乙醇:分析纯,上海源叶生物科技有限公司;

六水合氯化铁、六水合氯化铝:分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;

二水合氯化铜:分析纯,上海阿拉丁生化科技有限公司;

氢氧化钠:分析纯,上海毕得医药科技股份有限公司;

浓盐酸:分析纯,广州化学试剂厂;

乙腈:色谱纯,上海阿拉丁生化科技有限公司;

乙酸:色谱纯,上海麦克林生化科技有限公司;

酪氨酸酶(菌菇源)、还原型辅酶I(NADH)、黄素腺

嘌呤二核苷酸(FAD):上海源叶生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

精密电子天平:BSM-220.4型,上海卓精电子科技有限公司;

集热式恒温加热磁力搅拌器:HS8Pro型,群安科学仪器(浙江)有限公司;

纯水机:AZX-08UC-C3+2B型,深圳市安吉尔实业有限公司;

超声波清洗机:CD-D10型,亦为超声技术(深圳)有限公司;

紫外—可见分光光度计:UV-3200S型,上海美谱达仪器有限公司;

高效液相色谱仪:Agilent 1200型,美国安捷伦(Agilent)公司;

pH计:PHS-3E型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

气浴振荡摇床:TS-200B型,苏州川恒仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液与供试溶液制备

(1) 4-羟基苯乙醇(HPET)标准储备液(100 mmol/L):精确称取HPET 138.16 mg,溶于适量超纯水中,超声助溶5 min,转移至10 mL容量瓶,定容,4℃避光保存。

(2) 3,4-二羟基苯乙醇(DHPET)标准储备液(100 mmol/L):精确称取DHPET 154.16 mg,按上述方法配制,储存于棕色玻璃瓶。

(3) 系列单组分标准工作液(0~100 mmol/L):分别移取DHPET(或HPET)标准储备液至10 mL容量瓶中,用超纯水定容,配制10~100 mmol/L系列溶液。

(4) DHPET/HPET混合标准溶液(模拟实际样品):移取9.8 mL 100 mmol/L DHPET+0.2 mL 100 mmol/L HPET,定容至10 mL,即得98% DHPET(2% HPET)混合液。移取9.6 mL DHPET+0.4 mL HPET,定容至10 mL,即得96% DHPET(4% HPET)混合液。以此类推,按比例配制94%,92%,90% DHPET混合液。

(5) 氯化铁溶液(100 mmol/L):称取FeCl₃·6H₂O 270.3 mg,溶于5 mL超纯水,加入10 μL浓盐酸抑制水解,磁力搅拌10 min,转移至10 mL容量瓶,定容至刻度线,4℃避光保存。

(6) 氯化铜溶液(100 mmol/L):称取CuCl₂·2H₂O 170.48 mg,溶于超纯水,超声溶解后定容至10 mL,储存于棕色瓶。

(7) 氯化铝溶液(100 mmol/L, AlCl₃·6H₂O):称取AlCl₃·6H₂O 241.43 mg,溶于超纯水,定容至10 mL,现用现配。

(8) 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取NaOH 0.4 g,溶于超纯水,定容至10 mL,现用现配。

(9) 稀盐酸溶液(1 mol/L):量取8.26 mL,溶于5 mL超纯水,定容至100 mL,避光保存。

1.2.2 显色试剂选择 在比色管中依次加入体积比为 3:1 的 HPET 或 DHPET 标准溶液 (100 mmol/L) 与金属离子 (Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+}) 标准溶液。摇匀后放置,同时配制相应的试剂空白溶液,以试剂空白作参比在 190~900 nm 区间内用 10 mmol/L 比色皿测量吸光度,扫描间隔 1 nm。

1.2.3 显色底物选择 采用 DHPET/HPET 混合标准溶液模拟实际样品,按 1.2.2 体系配制反应液后以相同方法测量。

1.2.4 反应条件优化

(1) 浓度优化:在比色管中依次加入体积比为 3:1,2:1,1:1,1:2,1:3 的 HPET 或 DHPET 标准溶液 (100 mmol/L) 与筛选后金属离子标准溶液,检测方法同 1.2.2。

(2) 酸碱度优化:依照上述方法配制显色体系,在比色管中依次加入不同量的氢氧化钠标准溶液调节 pH,检测方法同 1.2.2。

1.2.5 方法特性指标确认 根据 HJ 168—2020 方法,特性指标包括检出限、测定范围(测定下限、测定上限)、准确度(精密度、正确度)。

(1) 检出限(LOD 值)验证:分别准确加入浓度 10~100 mmol/L DHPET 标准溶液配制梯度。同 1.2.2 试验方法操作测量吸光度绘制工作曲线。重复 7 次空白试验,回归计算后扣除空白值后与 0.01 吸光度相对应的浓度值作为检出限,按式(1)计算方法检出限。以 4 倍检出限作为测定下限。结合方法校准曲线的上限、适宜的稀释倍数,测定方法上下限。

$$L_{OD} = \frac{0.01}{b}, \quad (1)$$

式中:

L_{OD} ——检出限,mmol/L;

b ——工作曲线斜率。

(2) 精密度和正确度验证:选取高、中、低 3 个不同浓度水平的统一样品进行测定。其中,高浓度样品选择校准曲线线性范围上限附近浓度,中浓度样品选择校准曲线中间点附近浓度,低浓度样品选择测定下限附近浓度。按上述方法配制 10, 50, 80 mmol/L DHPET/HPET 混合标准溶液模拟实际样品,每个浓度水平的样品按照全程序进行至少 6 次平行测定。分别计算各浓度水平下测定结果的平均值($\bar{x}$)、标准偏差(SD)、相对标准偏差(RSD)及相对误差(RE),以表征方法的重复性和精密度,评估方法的准确性和可靠性。全面验证方法在不同浓度范围内的精密度与正确度,确保分析结果的稳定性和准确性。分别按式(2)和式(3)计算相对标准偏差和相对误差。

$$R_{SD} = \frac{S_D}{\bar{x}} \times 100\%, \quad (2)$$

$$R_E = \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

R_{SD} ——相对标准偏差,mmol/L;

R_E ——相对误差,mmol/L;

S_D ——标准偏差,mmol/L;

$\bar{x}$ ——平均值,mmol/L;

μ ——标准物质的浓度(含量),mmol/L。

1.2.6 方法比对与验证

(1) 实际样品制备:在 50 mL 去离子水中溶解 40 mmol/L 4-羟基苯乙醇后,加入 2 mL 酪氨酸酶液 (200 U/mL)、1 mmol/L NADH 和 3 μ mol/L FAD 作为酶还原剂。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒速通气 0.8 L/min 条件下,酶促反应 1.5, 3.0 h 后分别取样,分别标记为 1.5 h (样品 1)、3.0 h (样品 2)。

(2) 方法比对:对实际催化反应样品采集 2 个浓度水平接近的样品,分别采用新方法(分光光度法)与旧方法标准(液相色谱法)进行测定,获得至少 7 组配对测定数据。其中液相色谱分析条件:色谱柱为反相 ODS 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5.0 μ m);流动相:乙腈—0.1% 乙酸水溶液 ($V_{\text{乙腈}}:V_{0.1\% \text{ 乙酸水溶液}}=20:80$);流动相流速 1.0 mL/min;紫外检测波长 270 nm;柱温 25 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10.0 μ L;分析时长 10 min。

(3) 加标比对:向同一实际催化反应样品中加入标准溶液,通过分光光度法与液相色谱法 2 种方法同时测定样品及加标后催化样品浓度。加标质量浓度分别为 10, 20, 40 mg/mL。按式(4)~式(6)计算加标回收率、加标回收率的标准偏差。

$$P_i = \frac{\bar{y}_i - \bar{x}_i}{\mu}, \quad (4)$$

$$S_{\bar{P}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l (P_i - \sum_{i=1}^l P_i / l)^2}{l-1}}, \quad (5)$$

$$\bar{P} \pm 2S_{\bar{P}} = \frac{\sum_{i=1}^l P_i}{l} \pm 2\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l (P_i - \sum_{i=1}^l P_i / l)^2}{l-1}}, \quad (6)$$

式中:

$\bar{x}_i$ ——第 i 个对某一浓度或含量水平样品测试的平均值,mmol/L;

$\bar{y}_i$ ——第 i 个对加标样品测试的平均值,mmol/L;

μ ——加标量(加标后的浓度不应超过方法线性范围的上限),mmol/L;

P_i ——第 i 个加标回收率,mmol/L;

l ——测定加标回收率总个数;

$\bar{P}$ —— l 个验证加标回收率的均值,mmol/L;

$S_{\bar{P}}$ —— l 个验证实验室加标回收率的标准偏差,mmol/L。

1.2.7 数据处理 所有试验结果表示为平均值 $\pm$ 标准差。使用 SPSS Statistics 22.0 软件进行回归分析。利用 Origin 2021 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 吸收光谱特征

2.1.1 不同金属离子络合作用 如图1所示,3,4-二羟基苯乙醇(DHPET)及4-羟基苯乙醇(HPET)在未与金属复合时,其紫外光谱分别在210 nm和约270 nm处显示出两段特征的酚类物质吸收带,这些吸收带源自 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的K-bands以及苯环共轭的B-bands^[8],与DHPET/HPET的典型光谱特性及文献[9]报道一致。在不同金属离子与DHPET及其结构类似物HPET的络合反应中,观察到显著的溶液颜色变化及紫外—可见吸收光谱特征差异。

随着络合物形成,明显发现在Cu²⁺与Al³⁺体系中,Cu²⁺初始溶液呈浅蓝色,与DHPET/HPET反应后迅速褪为无色透明,与Al³⁺反应产生的无色透明体系表现一致,均在200~300 nm紫外区出现强吸收峰[图1(c)、图1(d)],归属为酚羟基 $\rightarrow$ 金属离子的配体—金属电荷转移(LMCT)跃迁,其峰形和强度与Nguyen等^[10]报道的多酚—金属络合物特征的特征峰一致,表明络合物形成导致金属离子d-d电子跃迁信号消失^[11]。而在Fe³⁺体系中,Fe³⁺溶液与DHPET/HPET反应后颜色演变呈现动力学依赖性——在可见光区(HPET-Fe 580~600 nm;DHPET-Fe 720~760 nm)呈现特征吸收[图1(b)],提示Fe³⁺与邻苯二酚、苯酚基团的配位过程存在络合机制,且DHPET-Fe的红移现象表明其配位位点或配体场强度与HPET-Fe存在差异。

2.1.2 DHPET与HPET间光谱差异 图2的紫外—可见光谱显示,DHPET-Fe络合物在760 nm处出现宽吸收带,相较于HPET-Fe(580 nm)红移,表示邻苯二酚基团(DHPET)的双齿配位方式增强了配体场分裂能,而HPET的单酚羟基形成的单齿配位导致较弱的配位效应^[12]。进一步分析表明,DHPET-Fe的八面体配位结构中,邻苯二酚氧原子与Fe³⁺形成双齿螯合,引发 $\pi \rightarrow d\pi^*$ 跃迁与LMCT协同效应;而HPET-Fe的单齿配位仅涉及酚羟基氧原子与Fe³⁺结合,形成六配位复合物^[13]。

图3显示溶液颜色与图2光谱特征的对应性,HPET-Fe 580~600 nm处的吸收峰,该波段对应视觉呈现蓝紫色显色反应,DHPET-Fe 720~760 nm处的吸收峰,对应视觉呈现深绿色显色反应(图3),而其他金属—多酚体系(如HPET/DHPET-Cu和HPET/DHPET-Al)及空白对照均无此响应,证实了金属—多酚络合物的特异性生成,这启发了进一步思考比色分析的可行性,表明Fe³⁺适用于基于比色法的DHPET快速检测,而Al³⁺与Cu²⁺络合物因紫外区信号重叠且无可见光响应,检测特异性受限。

DHPET-Fe络合物紫外—可见吸收光谱在760 nm处呈现特异性吸光度增强,与日光下DHPET-Fe溶液特有的深绿色显色现象和谐对应,证实了该络合反应对DHPET的高选择性。浓度梯度试验显示,760 nm处的吸光度值与DHPET浓度(20~100 mmol/L)呈显著线性正相关,且溶液颜色随浓度升高由浅绿渐变为深绿色,符合朗伯—比尔定律,表明该波长下的吸光信号可作为DHPET定量

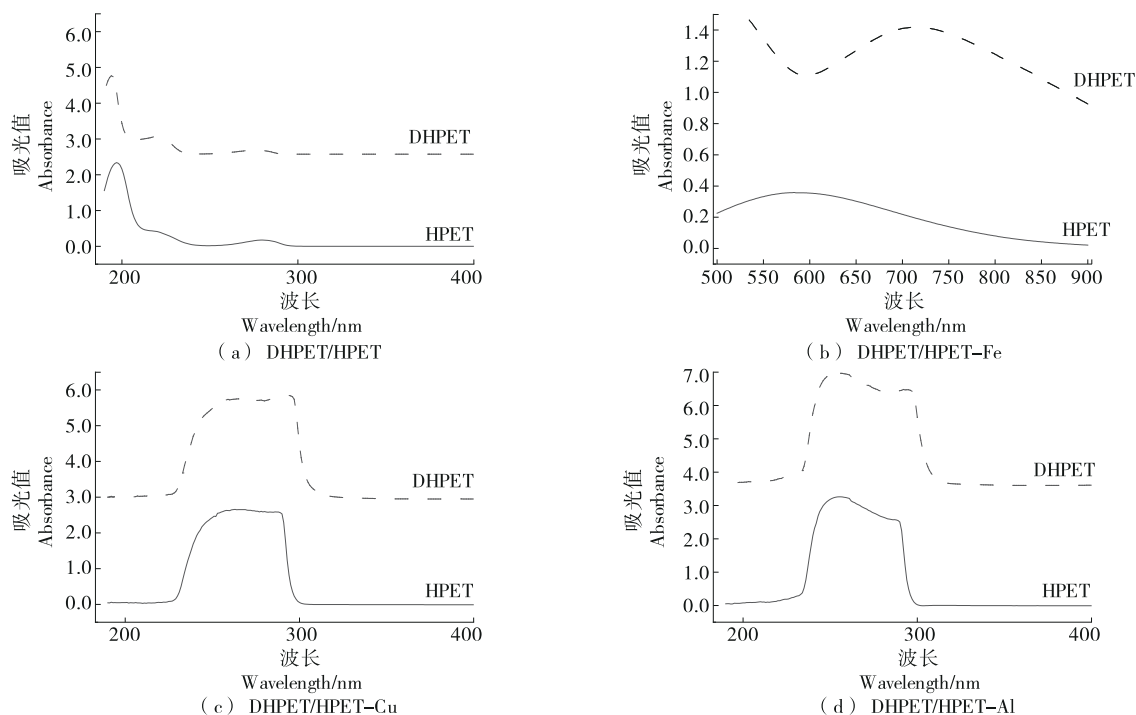
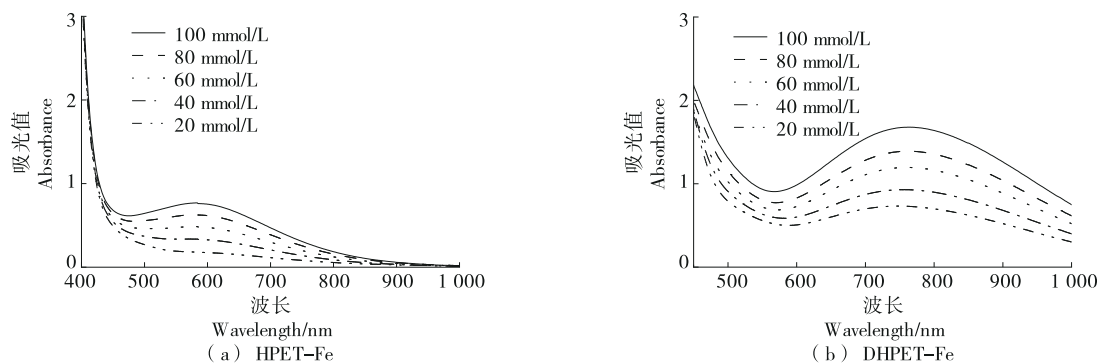
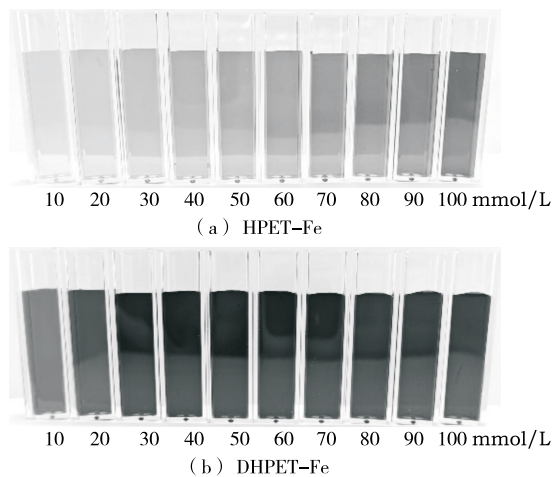


图1 HPET/DHPET在不同金属离子作用下的紫外—可见光吸收光谱

Figure 1 UV-vis absorption of HPET/DHPET in the presence of different metal ions

图2 在 Fe^{3+} 络合作用下的紫外—可见光吸收浓度梯度Figure 2 UV-visible absorption concentration gradients under Fe^{3+} complexation图3 在 Fe^{3+} 络合作用下的梯度显色结果Figure 3 Gradient color development results under Fe^{3+} complexation

分析的可靠指标。值得注意的是,HPET-Fe体系在580 nm处也表现出浓度依赖性吸光度增强及蓝紫色显色现象,但其响应强度($\Delta A < 0.03$)远低于DHPET-Fe体系($\Delta A > 0.15$),可归因于HPET单酚羟基结构的单齿配位模

式相较于DHPET邻苯二酚双齿配位的弱配体场效应^[14]。以上结果表明,DHPET-Fe相较于HPET-Fe体系有更强的选择特异性。

2.1.3 混合样品试样 为验证DHPET-Fe检测体系的选择性,对DHPET/HPET混合样品进行紫外—可见光谱分析,见图4。结果表明,HPET-Fe在580~600 nm的特征吸收峰完全消失[图4(a)],而DHPET-Fe在410~420, 770~780 nm处呈现特征吸收带[图4(c)],其中773.43 nm处的宽吸收带(半峰宽314.81 nm)依然与图3中日光显色现象形成光谱—视觉对应关系,且760 nm吸光值拟合曲线呈强线性相关[图4(b)],证明双齿螯合优先级远高于单齿螯合。

该宽谱带源于八面体配位场中多重能级跃迁的叠加效应^[15],其显著峰面积占比64.24%(表1),证实双齿配位模式具有更高的配位稳定性。760 nm的特异性响应源于邻苯二酚基团的双齿螯合作用,极大可能由于空间位阻效应使DHPET优先占据 Fe^{3+} 配位位点,形成双齿络合物,其配位稳定常数较HPET单齿配位模式高,从而有效抑制竞争性结合^[16]。上述试验现象证明,DHPET-Fe作为分光光度检测法的可行性。

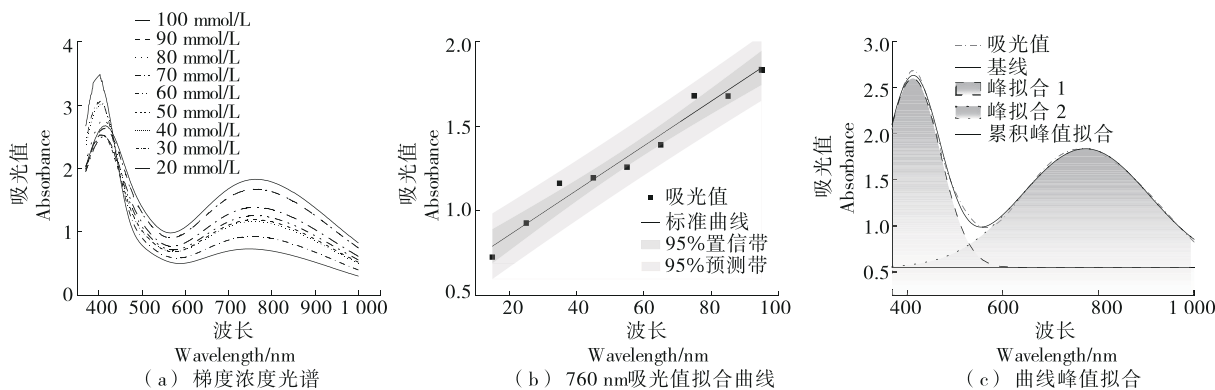
图4 Fe^{3+} 络合作用下的DHPET/HPET混合样品紫外—可见光吸收Figure 4 UV-visible absorption of mixed DHPET/HPET samples under Fe^{3+} complexation

表1 DHPET紫外-可见光吸收曲线峰值拟合数据[†]

Table 1 DHPET UV-Vis absorption curve peak fit data

波峰序号	峰值类型	拟合数据波峰面积	半峰宽	最大高度	波峰加权平均中心	拟合数据波峰面积百分比/%
1	Gaussian	228.260 73	135.430 36	2.041 07	413.619 89	35.757 57
2	Gaussian	410.095 65	314.805 83	1.283 28	773.425 93	64.242 43

[†] 卡方为 $7.530\ 29 \times 10^{-4}$; 调整 R^2 为 0.996 539。

2.2 吸收光谱条件优化

2.2.1 最佳反应浓度条件 在 pH 7.0 条件下,通过调节 DHPET 与 FeCl₃ 的摩尔比 (1:5~5:1),系统研究配位平衡对 DHPET-Fe 络合物形成的影响,见图 5。结果表明, DHPET 过量的样品在 750 nm 处观察到最大吸光度,对应于邻苯二酚双齿配位形成的稳定八面体络合物,此时 Fe³⁺ 配位点被 DHPET 饱和,抑制了游离金属离子的氧化活性^[17]。Fe³⁺ 过量的条件下,吸光峰蓝移至 720 nm,且吸光度显著降低,表明过量 Fe³⁺ 通过芬顿反应引发 DHPET 的氧化降解,生成醌类产物^[18]。同时部分 Fe³⁺ 以游离态或羟基水合离子 [Fe(H₂O)₆]³⁺ 形式存在,导致配位信号减弱^[19]。

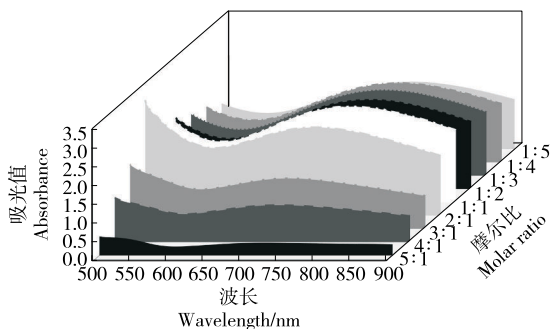


图5 配位平衡对DHPET-Fe络合物形成的影响

Figure 5 Effect of coordination equilibrium on the formation of DHPET-Fe complexes

上述现象证实,DHPET 与 Fe³⁺ 的摩尔比显著影响络合物的形成与稳定性。优化配比 (1:1) 时,750 nm 吸光度达峰值 ($A=2.52$),且溶液呈均一深绿色,表明双齿配位主导络合机制;而 Fe³⁺ 过量引发的氧化副反应可能干扰定量检测,需通过控制金属离子浓度予以抑制。

2.2.2 最佳反应 pH 如图 6 所示,Fe³⁺ 的配位水合作用通过降低配位水 pK_a 促使羟基解离^[20],释放的质子驱动金属氢氧化物前驱体形成,进而影响 DHPET 的螯合能力,使 DHPET 与 Fe³⁺ 的配位行为呈显著 pH 依赖性。酸性区间 (pH 3~5) 中儿茶酚羟基质子化 (—OH),与 Fe³⁺ 仅通过单齿配位结合,形成不稳定的单核络合物^[21],导致紫外光谱在 580 nm 处呈现弱吸收,且无可见显色。当 pH 升至近中性区间 (pH 6.6) 时,羟基去质子化形成邻苯二酚负离子,与 Fe³⁺ 形成双齿螯合八面体结构^[22],770 nm 处出现强

LMCT 吸收带,溶液显深绿色。而当进入碱性区间 (pH > 7.5) 时出现酒红色配合物,其 420 nm 处蓝移吸收带对应三齿配位构型^[23],该结构的形成导致摩尔吸光系数降低约 40%。进一步增加 pH 至 8 后将引发 Fe(OH)₃ 沉淀,导致信号衰减^[24]。综上,pH 6.6 条件下,双齿配位主导的强 LMCT 效应与高稳定性,使其成为 DHPET 分光光度检测的最优窗口。

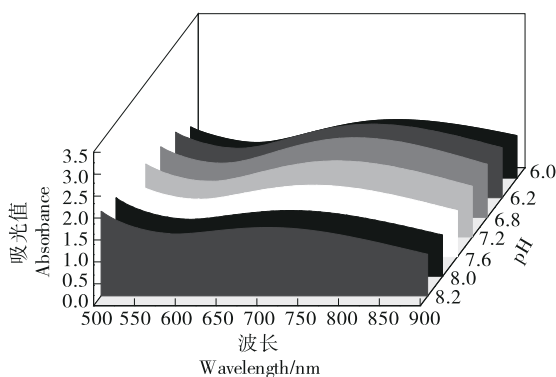


图6 酸碱环境对DHPET-Fe络合物形成的影响

Figure 6 Effect of acid-base environment on the formation of DHPET-Fe complexes

2.3 DHPET 检测方法建立

2.3.1 标准曲线 梯度配制 10~100 mmol/L 区间内 3,4-二羟基苯乙醇 (DHPET) 标准溶液,分别与 100 mmol/L FeCl₃ 溶液按 1:1 体积混合,调整 pH 6.6,室温避光反应 1 min。于 760 nm 处测定吸光度 (A),以 DHPET 浓度为横坐标、 A 值为纵坐标拟合线性方程 (见 2.3.2)。取待测液体与等体积 FeCl₃ 溶液反应,同标准曲线条件方法进行反应后测定吸光度 (A) 值,代入方程计算 DHPET 浓度。

2.3.2 方法检出限与精密性 针对上述标曲进行线下拟合,结果如图 7 所示。

以 DHPET 标准品为自变量,对应吸光值为因变量,进行偏最小乘法拟合,得到拟合方程如表 2 所示。吸光度与浓度在 10~100 mmol/L 范围呈良好的线性关系,其线性回归方程为: $Y=0.014\ 09x+0.654\ 22$, 决定系数 $R^2=0.991\ 82$ 。计算得检出限 MDL 值为 0.709,以 4 倍检出限作为测定下限,结果见表 2。

相对标准偏差 (RSD) 与相对误差 (RE) 是衡量模型预测值与真实值误差的指标,二者值越小模型可靠性越强。

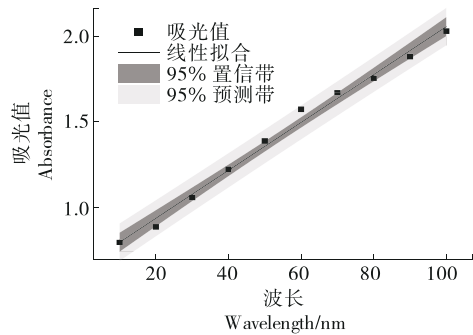


图 7 DHPET 标准曲线拟合
Figure 7 DHPET labelled curve fitting

表 2 拟合方程及其检出限
Table 2 Fitting equations and their detection limits

编号	浓度/ (mmol·L ⁻¹)	吸光度	回归直线	检出限	测定 下限
1	100	2.037 61	$Y=0.014\ 09x+0.654\ 22$	0.709	2.836
2	90	1.888 10			
3	80	1.760 99			
4	70	1.676 43			
5	60	1.576 99			
6	50	1.390 70			
7	40	1.224 88			
8	30	1.058 03			
9	20	0.885 40			
10	10	0.795 20			

结果表明,DHPET 浓度在 10~90 mmol/L 范围时,相对标准偏差为 0.30%~1.92%,相对误差为-0.40%~0.62%,表

明模型的精度高,精密度检测试验结果见表 3。

为进一步检验模型的可靠性,对模型进行复合残差分析,如图 8 所示。正态概率图紧密贴合参考线;残差—拟合值散点图未检测到显著的非线性模式,呈现随机点状分布模式,均不超过临界值 $t_{0.025}(8)=2.306$,有效支持模型线性设定;数据序列图于水平轴上无规则变化;残差分布直方图呈现近似对称结构且中心化于零点,虽存在轻微左偏现象,但仍满足正态分布假设。

2.3.3 方法比对与实际酶促样品验证 如图 9 所示,紫外—可见分光光度法(Vis-UV)与高效液相色谱法(HPLC)对 DHPET 的定量分析均表现出优异线性,其标准曲线相关系数(R^2)分别达 0.995 9,0.999 9。

但高效液相色谱法由于色谱柱容量的限制,浓度过高时无法准确定量,需要对样品进行稀释,而分光光度法虽检测限较高,但其线性范围更宽,无需复杂前处理即可直接测定催化反应液中的 DHPET 浓度。采用实际酶促反应样品,通过液相色谱法进行进一步方法比对验证,色谱图如图 10 所示。可以明显发现,随着酶催化反应的进程,样品 2 的 DHPET 浓度相较于样品 1 上升,HPET 浓度下降。

DHPET 相较于 HPET 因邻苯二酚结构多一个酚羟基,其极性 with 亲水性显著增强,导致在反相色谱中保留时间缩短。试验表明,DHPET 的保留时间为 (6.5 ± 0.3) min,而 HPET 为 (8.3 ± 0.3) min。尽管 HPLC 法可实现高分辨率分离,但其单次分析耗时长达 25~40 min,相较于分光光度法时间效率偏低。因此,在催化工艺优化中,分光光度法可更好地用于实时监控,而 HPLC 作为仲裁方法用于痕量杂质鉴定。以上双方法标准溶液精密度试验对比见表 4。

表 3 精密度检测试验
Table 3 Precision testing experiment

编号	低浓度			中浓度			高浓度		
	吸光度	测量值/ (mmol·L ⁻¹)	实际值/ (mmol·L ⁻¹)	吸光度	测量值/ (mmol·L ⁻¹)	实际值/ (mmol·L ⁻¹)	吸光度	测量值/ (mmol·L ⁻¹)	实际值/ (mmol·L ⁻¹)
1	0.792	9.779	10	1.365	50.446	50	1.782	80.041	80
2	0.793	9.850		1.364	50.375		1.763	78.693	
3	0.796	10.062		1.357	49.878		1.791	80.680	
4	0.799	10.275		1.325	47.607		1.772	79.331	
5	0.795	9.991		1.365	50.446		1.785	80.254	
6	0.796	10.062		1.342	48.813		1.791	80.680	
7	0.797	10.133		1.349	49.310		1.765	78.835	
8	0.800	10.346		1.360	50.091		1.779	79.828	
$\bar{x}/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$		10.062 4			49.798 0			80.039 4	
SD/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$		0.193 4			0.661 9			0.266 7	
RSD/%		1.92			1.33			0.30	
RE/%		0.62			-0.40			0.04	

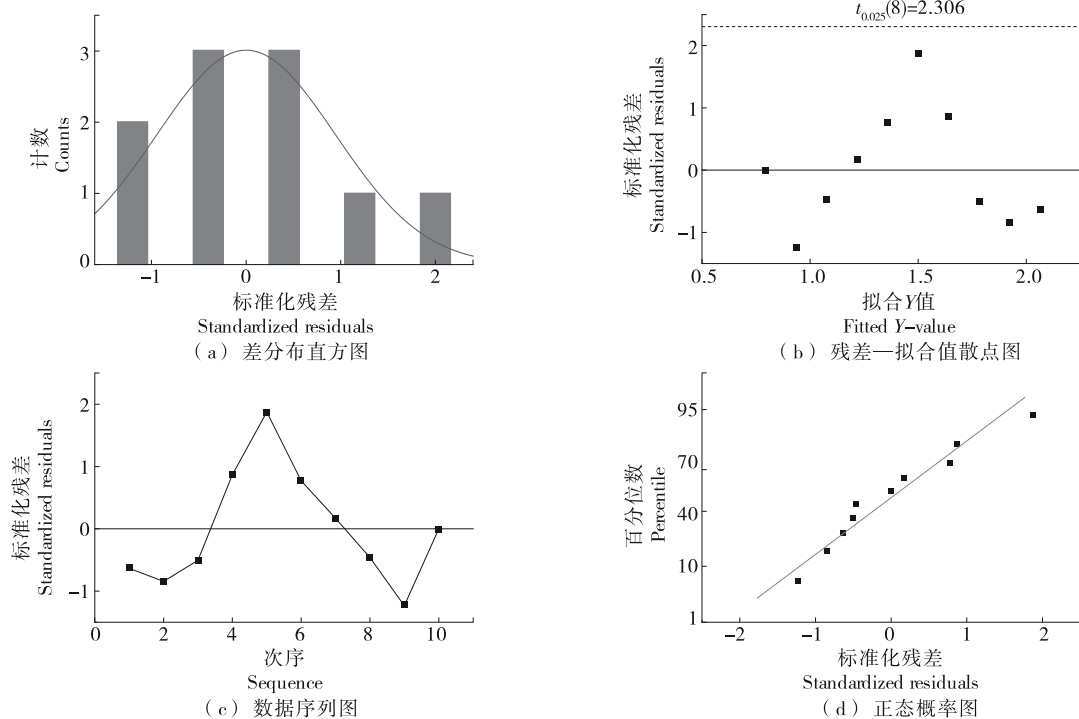


图 8 复合残差分析图

Figure 8 Composite residual analysis plot

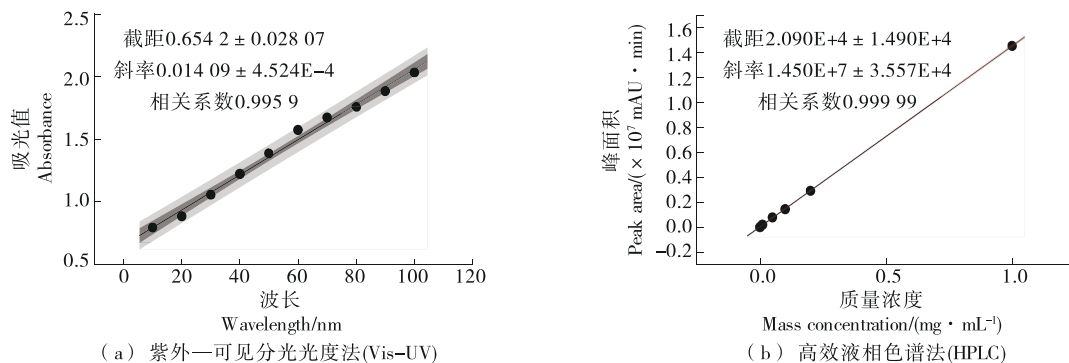


图 9 标准曲线对比图

Figure 9 Standard curve comparison chart

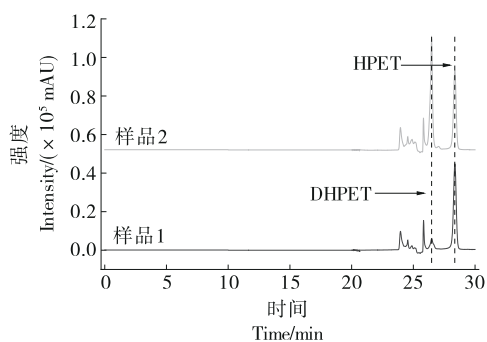


图 10 实际酶促样品高效液相色谱(HPLC)图对比

Figure 10 Comparison of high-performance liquid chromatograms of actual enzymatic samples

两种方法的精密度均在可接受范围内,配对差值双侧显示两组数据无显著性差异($P>0.05$),证实分光光度法在催化体系监控中可替代HPLC用于常规分析,尤其在需频次高、快速反馈的工艺优化场景中更具应用优势。进一步对其中实际反应样品1进行加标试验分析,结果见表5。

紫外-可见分光光度法(Vis-UV)与高效液相色谱法(HPLC)对DHPET的加标回收率均表现良好,表明两种方法的准确度均满足分析要求。进一步对比发现:HPLC检测限更低,适用于样本组分痕量分析,但其单次分析耗时较长,且仪器维护成本高昂,限制了其在合成工艺优化中的高频次应用^[25];Vis-UV的检测限较高,但分析速度提

表 4 双方法标准溶液精密度试验对比

Table 4 Comparison of precision tests of standard solutions of both methods

编号	分光光度法测定值/(mg·mL ⁻¹)		液相色谱法测定值/(mg·mL ⁻¹)		配对差值/(mg·mL ⁻¹)	
	样品 1	样品 2	样品 1	样品 2	样品 1	样品 2
1	3.247 1	22.678 5	3.318 3	22.629 2	0.071 2	0.049 3
2	3.290 9	22.722 2	3.319 3	22.630 6	0.028 4	0.091 7
3	3.367 4	22.383 1	3.318 7	22.629 5	0.048 7	0.246 5
4	0.104 0	3.214 3	22.744 1	3.318 3	22.629 0	0.115 2
5	0.071 0	3.247 1	22.547 2	3.318 1	22.629 5	0.082 3
6	3.334 6	22.667 5	3.319 9	22.630 1	0.014 7	0.037 5
7	3.312 7	22.536 2	3.320 1	22.628 4	0.007 3	0.092 2
平均值/(mg·mL ⁻¹)	3.287 73	22.611 27	3.318 95	22.629 48	0.049 34	0.102 08
标准偏差/(mg·mL ⁻¹)	0.054 60	0.128 75	0.000 81	0.000 71	0.034 96	0.069 02
RSD/%	1.661	0.569	0.024	0.003		
P 值					0.16	0.71

表 5 双方法加标对比分析

Table 5 Comparative analysis of bifurcated labelling

编号	分光光度法测定值/(mg·mL ⁻¹)			液相色谱法测定值/(mg·mL ⁻¹)		
	10 mg/mL	20 mg/mL	40 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL	40 mg/mL
1	13.302 0	22.621 4	42.318 0	13.269 2	23.366 9	42.334 6
2	13.345 7	22.577 6	42.646 2	13.269 8	23.368 4	42.333 6
3	13.334 8	22.643 2	42.099 1	13.268 5	23.367 3	42.332 4
4	13.312 9	22.621 4	42.536 8	13.269 2	23.368 9	42.333 0
5	13.291 0	22.599 5	42.427 4	13.269 4	23.367 6	42.334 9
6	13.345 7	22.665 1	42.427 4	13.268 5	23.366 6	42.332 7
7	13.389 5	22.577 6	41.989 7	13.268 8	23.368 4	42.333 3
平均值/(mg·mL ⁻¹)	13.331 66	22.615 11	42.349 22	13.269 06	23.367 71	42.333 49
回收率/%	100.44	96.64	97.65	99.81	100.40	97.61
回收率均值/%		98.24			99.28	
S _p /%		1.97			1.47	

升,若使用酶标仪批量检测可实现每小时超 300 个样本高速检测,且无需复杂前处理,适用于生物—化学催化合成体系中 DHPET 的实时浓度监控。综上,在 DHPET 工业化合成工艺开发中,分光光度法凭借其高效率、操作简易性及可集成的潜力,展现出显著的经济效益优势。

3 结论

该研究基于 Fe³⁺ 配位化学调控原理,构建了 3,4-二羟基苯乙醇的高选择性紫外—可见分光光度法检测体系。通过 Fe³⁺ 与 3,4-二羟基苯乙醇邻苯二酚基团的双齿螯合作用,诱导特征吸收光谱红移至 760 nm,显著区别于单酚羟基化合物的弱配位响应,解决了传统紫外法因光谱重叠导致的选择性不足问题。在优化条件 pH 6.6,3,4-二羟基苯乙醇/Fe³⁺ 摩尔比 1:1 下,方法线性范围达 3~100 mmol/L ($R^2>0.99$),检出限为 0.709 mmol/L,精密度(相对标准偏差 $<2\%$)和加标回收率(98.24%)满足工业催化体系实时监控需求,检测效率较高效液相色谱法提

升,单样检测时间由 25 min 以上缩减至 3 min,且无需复杂前处理。

紫外—可见分光光度法检测限仍高于高效液相色谱法,对痕量分析的适用性受限,且复杂基质中 Fe³⁺ 与其他多酚的竞争配位可能干扰检测精度。未来研究可聚焦以下方向:① 开发辅助信号放大策略以提升灵敏度;② 设计抗干扰配位体系,实现 3,4-二羟基苯乙醇合成工艺的全流程智能化控制。

参考文献

[1] LEOPOLDINI M, MARINO T, RUSSO N, et al. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-Atom versus electron transfer mechanism[J]. The Journal of Physical Chemistry A, 2004, 108(22): 4 916-4 922.

[2] 刘文彬, 陈婵, 唐伟康. 一种模拟酶催化反应合成羟基酯醇的方法: CN115010583A[P]. 2022-09-06.

LIU W B, CHEN C, TANG W K. A method for synthesizing

- hydroxytyrosol by mimicking enzyme-catalyzed reaction: CN115010583A[P]. 2022-09-06.
- [3] ESPÍN J C, SOLER-RIVAS C, CANTOS E, et al. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(3): 1 187-1 193.
- [4] PIÑEIRO Z, CANTOS-VILLAR E, PALMA M, et al. Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(21): 11 683-11 689.
- [5] MIRALLES P, CHISVERT A, SALVADOR A. Determination of hydroxytyrosol and tyrosol by liquid chromatography for the quality control of cosmetic products based on olive extracts[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015, 102: 157-161.
- [6] SUN P, SHANG M Z, XIE R Y, et al. Dual-mode fluorimetric and colorimetric sensors based on iron and nitrogen co-doped carbon dots for the detection of dopamine[J]. Food Chemistry, 2024, 445: 138794.
- [7] ESPINA A, CAÑAMARES M V, JURAŠEKOVÁ Z, et al. Analysis of iron complexes of tannic acid and other related polyphenols as revealed by spectroscopic techniques: implications in the identification and characterization of iron gall inks in historical manuscripts[J]. ACS Omega, 2022, 7(32): 27 937-27 949.
- [8] 佟静, 李象远. 酪氨酸与色氨酸间电子转移——氧化还原活性及电子跃迁能的从头算研究[J]. 化学学报, 2002(6): 1 029-1 034.
- TONG J, LI X Y. Electron Transfer between tryptophan and tyrosine—*ab initio* study on redox reactivity and electronic transition energy[J]. Acta Chimica Sinica, 2002(6): 1 029-1 034.
- [9] OWEN R W, HAUBNER R, MIER W, et al. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes[J]. Food and Chemical Toxicology, 2003, 41(5): 703-717.
- [10] NGUYEN M, MEUNIER B, ROBERT A. Catechol-based ligands as potential metal chelators inhibiting redox activity in alzheimer's disease[J]. European Journal of Inorganic Chemistry, 2017, 2 017(25): 3 198-3 204.
- [11] 宦双燕, 王玉枝, 游常军. 波谱分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2023: 8-17.
- HUAN S Y, WANG Y Z, YOU C J. Spectral analysis[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2023: 8-17.
- [12] LO S I, LU J W, CHEN W J, et al. Functional model for catecholase-like activity: synthesis, structure, spectra, and catalytic activity of iron (III) complexes with substituted-salicylaldehyde ligands[J]. Inorganica Chimica Acta, 2009, 362 (13): 4 699-4 705.
- [13] KITOS A A, PAPATRIANTAFYLLOPOULOU C, TASIOPOULOS A J, et al. Binding of ligands containing carbonyl and phenol groups to iron (iii): new Fe₆, Fe₁₀ and Fe₁₂ coordination clusters[J]. Dalton Trans, 2017, 46(10): 3 240-3 251.
- [14] LEWIS R W, MALIC N, SAITO K, et al. Linear coordination polymer synthesis from bis-catechol functionalized raft polymers[J]. Macromolecular Rapid Communications, 2020, 41(18): 2000366.
- [15] LI Y R, WEN J, QIN M, et al. Single-molecule mechanics of catechol-iron coordination bonds[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2017, 3(6): 979-989.
- [16] CRISPONI G, NURCHI V M, PIVETTA T. Potentiometric and spectrophotometric equilibrium study on Fe (III) and new catechol-bisphosphonate conjugates[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2008, 102(2): 209-215.
- [17] ANDJELKOVIC M, VANCAMP J, DEMEULENAER B, et al. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups[J]. Food Chemistry, 2006, 98(1): 23-31.
- [18] 张蕾. 基于配位场理论的有机配体助催化芬顿氧化过程机制研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2024: 78-84.
- ZHANG L. Mechanism study of organic ligands-assisted fenton oxidation process based on coordination field theor [D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2024: 78-84.
- [19] SEVER M J, WILKER J J. Absorption spectroscopy and binding constants for first-row transition metal complexes of a DOPA-containing peptide[J]. Dalton Trans, 2006(6): 813-822.
- [20] 江睿. Fe(II)与植酸在水铁矿表面的共吸附及其催化转化效应研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2022: 5-11.
- JIANG R. Study on co-sorption of phytate and Fe(II) on ferrihydrite and the effect of phytate on Fe(II) -catalyzed ferrihydrite transformation[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2022: 5-11.
- [21] XIAO J, WANG C, LYU S S, et al. Enhancement of Fenton degradation by catechol in a wide initial pH range[J]. Separation and Purification Technology, 2016, 169: 202-209.
- [22] INOMATA T, ENDO S, IDO H, et al. Iron (III) complexes with hybrid-type artificial siderophores containing catecholate and hydroxamate sites[J]. Inorganic Chemistry, 2023, 62(40): 16 362-16 377.
- [23] ELHABIRI M, CARRÈR C, MARMOLLE F, et al. Complexation of iron (III) by catecholate-type polyphenols[J]. Inorganica Chimica Acta, 2007, 360(1): 353-359.
- [24] SEVER M J, WILKER J J. Visible absorption spectra of metal-catecholate and metal-tironate complexes[J]. Dalton Transactions, 2004(7): 1 061-1 072.
- [25] 杨纯, 魏然, 孙文, 等. 分光光度法与高效液相色谱法检测甲醛含量的方法比较[J]. 印染助剂, 2024, 41(5): 49-52.
- YANG C, WEI R, SUN W, et al. Comparison of methods for determination of formaldehyde content by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography[J]. Textile Auxiliaries, 2024, 41(5): 49-52.